云 南 植 物 研 究 2008, 30 (4): 464～470
Acta Botanica Yunnanica DOI: 10.3724 SP.J.1143.2008.07161

大花蕙兰子房授粉前后基因组 DNA 胞嘧啶甲基化状态的 MSAP 分析*

陈小强[1,2], 王春国[1], 李秀兰[1], 宋文芹[1**], 陈瑞阳[1]
(1 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2 天津农学院 农学系, 天津 300384)

摘要: 应用甲基化敏感扩增多态性 (Methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP) 技术分析了大花蕙兰 (*Cymbidium hybridium*) 授粉前后子房 DNA 甲基化状态的变化 (甲基化水平和甲基化差异模式)。采用 72 对引物进行选择性扩增, 共得到 5892 条带, 其中 748 条带为甲基化多态性带。结果显示 DNA 甲基化在大花蕙兰子房发育过程中发生频繁, 从授粉前后子房的总扩增位点甲基化水平 (14%和 11.4%) 和全甲基化率 (9.5%和 7.8%) 来看, 授粉后都略低于未授粉子房, 表明子房在授粉后的发育过程中在某些位点发生了去甲基化。除甲基化水平有变化外, 大花蕙兰子房授粉前后的 DNA 甲基化模式也存在较大差异, 共检测到 14 种带型, 分为两大类 (Ⅰ和Ⅱ型)。其中, 授粉前后 DNA 甲基化状态保持不变的位点较少, 只占 25.6%, 归为Ⅰ型; 大部分检测位点 (占 74.4%, 归为Ⅱ型) 的 DNA 甲基化模式在授粉前后存在显著差异。上述结果表明, 大花蕙兰子房发育过程中以 DNA 甲基化为代表的表观遗传调控起重要作用。本研究的开展将促进对与大花蕙兰子房发育相关的甲基化差异片段及受 DNA 甲基化调控的关键基因的克隆, 进而为从表观遗传学这一新角度揭示大花蕙兰子房发育的分子机制奠定基础。

关键词: DNA 甲基化; 大花蕙兰; 甲基化敏感扩增多态性 (MSAP); 子房发育
中图分类号: Q 943 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700 (2008) 04-464-07

Analysis of DNA Cytosine Methylation between the Non-pollinated and Pollinated Ovaries of *Cymbidium hybridium* (Orchidaceae) Based on MSAP

CHEN Xiao-Qiang[1,2], WANG Chun-Guo[1], LI Xiu-Lan[1],
SONG Wen-Qin[1**], CHEN Rui-Yang[1]
(1 *College of Life Sciences, Nankai University*, Tianjin 300071, China; 2 *Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University*, Tianjin 300384, China)

Abstract: The best known and most thoroughly studied epigenetic phenomena is DNA methylation, which plays an important role in regulating gene expression during plant regeneration and development. In this study, MSAP (methylation sensitive amplified polymorphism) technique was carried out to analyze differences of the methylation status between before and after pollination in ovaries of *Cymbidium hybridium*. 72 selective primer combinations were used to check the status of cytosine methylation DNA samples and a total of 5892 fragments were obtained. Thereinto, 748 fragments, each representing a recognition site cleaved by either or both of the isoschizomers (*Hpa* Ⅱ and *Msp* Ⅰ), were amplified, which were significant differences between the non-pollinated and the pollinated ovaries. The results demonstrated DNA methylation events occured in ovaries from *Cymbidium hybridium*. Both total and full methylation levels in the pollinated ovaries (11.4%,

* 基金项目: 863 计划 (2006AA100109) 和天津市支撑计划 (072CKFNC01200) 项目
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: songwq@nankai.edu.cn
收稿日期: 2007-08-02, 2008-04-03 接受发表
作者简介: 陈小强 (1976-) 女, 博士, 副教授, 主要从事植物细胞工程研究。E-mail: chenxia9663@126.com

7.8%) were lower than those in the non-pollinated ovaries (14%, 9.5%), which suggested some demethylations occurred. Furthermore, methylation patterns varied between the two ovaries. 14 types of MSAP patterns detected in the study belonged to two classes, type Ⅰ and Ⅱ. 25.6% of detected fragments belonged to Type Ⅰ and 74.4% were type Ⅱ. Distinct patterns of DNA methylation arising through demethylation or de novo methylation might have specialized functions. This suggested the significance of epigenetic function in the development of orchid ovaries. The hypothesis that DNA methylation played a role in the *C. hybridium* ovary development would help to lucubrate the methylation status of special genes, clone the fragments with different methylation patterns, and shed novel insights into the molecular mechanisms of the ovary and floral development of orchids from the point of view of epigenetics.

Key words: DNA methylation; *Cymbidium hybridium*; MSAP; Ovary development

进入后基因组学时代，表观遗传学 (epigenetics) 已成为当前分子生物学研究的热点之一。它是研究没有 DNA 序列变化的、可遗传的基因表达改变 (Jablonka and Lamb, 2002)。DNA 甲基化是表观遗传学的重要研究内容之一，参与基因的差异表达、胚胎发育、细胞分化、染色质失活、转基因沉默等生物学过程 (Rossi 等, 1997; Gonzalgo and Jones, 1997)。检测 DNA 甲基化的方法有多种，甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP) 技术是 Reyna-Lopez 等 (1997) 在 AFLP 技术基础上建立起来的，首次被用来检测真菌的基因组 DNA 甲基化。其独特之处是利用两个对 DNA 甲基化敏感程度不同的同裂酶，分别与一个对 DNA 甲基化不敏感的稀切酶如 *EcoR* Ⅰ一起对基因组 DNA 进行双酶切，然后再接上相应的限制性内切酶的接头，利用接头序列设计引物进行常规 AFLP 分析。由于所采用的限制性内切酶对 DNA 甲基化敏感性不同，因而相同序列就可扩增出不同的带型，以此判断 DNA 甲基化的程度。MSAP 技术常采用两个同裂酶，*Hpa* Ⅱ和 *Msp* Ⅰ，这两个酶都识别和切割 5′CCGG 的四核苷酸位点，但对甲基化敏感程度不同。*Hpa* Ⅱ对于 DNA 两条链上的该位点内外侧胞嘧啶均甲基化及任一个胞嘧啶甲基化都不能酶切，即不能酶切含 mCCGG, CmCGG 和 mCm CGG 的位点，但它可以识别仅一条链上胞嘧啶甲基化的位点。而 *Msp* Ⅰ可以识别 DNA 单链或双链上该位点内侧甲基化的胞嘧啶，但不识别外侧甲基化胞嘧啶，即不能酶切 mCCGG 的位点 (McClelland 等, 1994)。MSAP 技术已被广泛应用于多种植物基因组 DNA 甲基化的水平和模式分析 (Xiong and Xu, 1999; 仪治本等, 2005; Cervera 等, 2002; 洪柳和邓秀新, 2005; 华扬等, 2005)。

研究发现，DNA 甲基化在植物的生长发育过程中起着重要的调控作用 (朱玉贤和李毅, 1997; Finnegan 等, 2000); 在不同组织或同一组织的不同发育阶段，基因组 DNA 上各 CpG 位点甲基化状态存在差异 (Lund 等, 1995; Tanaka 等, 1997; Janousek 等, 2002)。Janousek 等 (2002) 分析了 *Silene Latifolia* 雄性繁殖器官特异性表达基因 (*MROS*1) 在花粉粒发育过程中的 DNA 甲基化状态，揭示其存在明显差异。陆光远等 (2005) 对油菜种子萌发过程中 DNA 甲基化状态的动态变化过程进行分析发现，种子萌发过程中同时发生甲基化和去甲基化事件，其中去甲基化占据主导地位。这表明植物在生长发育过程中通过 DNA 甲基化和去甲基化等表观遗传方式可实现基因的有序表达。

大花蕙兰 (*Cymbidium hybridium*) 属兰科，兰属。兰科 (Orchidaceae) 植物的特殊性是其子房的发育在授粉后才启动，是进行子房发育研究的较好材料 (Wang and Zhang, 1999; 朱根发和郭振飞, 2004)。本文首次利用 MSAP 从整个基因组水平上研究大花蕙兰子房授粉前后的 DNA 的甲基化水平的差异，分析大花蕙兰授粉后子房与未授粉子房甲基化模式及甲基化状态的变化，为授粉引起的甲基化差异片段的克隆、特定基因甲基化的深入探讨，表达调控基因的分离，进而为从表观遗传学的角度揭示调控大花蕙兰子房发育的分子机制奠定基础。

1　材料和方法

1.1　材料

大花蕙兰 (*Cymbidium hybridium*)，由市场购入粉红花品种‘Great Flower Marie Laurencin’，在开花 15～20 d

后，进行人工授粉，并于授粉后 2，4，8，16，24 d 同时取未授粉及授粉子房迅速冻于液氮中备用。

1.2 DNA 的提取

采用修改后的 CTAB（cetyltrimethyl ammonium bromide，十六烷基三乙基溴化铵）方法（Murray and Thompson，1980），同时提取大花蕙兰授粉前后子房的总 DNA，用不含 DNase 的 RNase（Takara）处理总 DNA，除去可能含有的 RNA 污染。用紫外分光光度计（NanoDrop 型号）测定 DNA 的浓度和纯度，琼脂糖凝胶（0.8%）电泳观察其质量。分别将从 5 个不同时期授粉和未授粉的子房提取的 DNA 等量混合，建立 2 个 DNA 池，用于后续实验来降低假阳性。总 DNA 存于 -20℃待用。

1.3 MSAP 分析

对大花蕙兰授粉前后子房 DNA 池稀释至 400 ng/μl，用识别四碱基的 *Hpa* Ⅱ和 *Msp* Ⅰ同裂酶（Promega）分别与识别六碱基的核酸内切酶 *EcoR* Ⅰ(Promega) 组合对样本 DNA 进行双酶切，DNA 酶切反应体系为 10 μl。第一个反应中，400 ng 样本 DNA，1×RT buffer (0.01 mol/L Tris-HCl、0.01 mol/L $MgAc_2$、0.05 mol/L KAc), *EcoR* Ⅰ和 *Hpa* Ⅱ内切酶各 3 U，37℃保温过夜。第二个反应的条件同第一个反应，只是内切酶组合为 *EcoR* Ⅰ和 *Msp* Ⅰ。随后，在酶切片段的两端加上人工设计的与 *EcoR* Ⅰ和 *Hpa* Ⅱ/*Msp* Ⅰ酶切位点互补的人工接头（表 1）。接头连接体系为 20 μl，1×RT buffer (含 1 mmol ATP)，1.5 U T4 连接酶（上海生工），各 50 pmol 的 *EcoR* Ⅰ和 *Hpa* Ⅱ/*Msp* Ⅰ接头，16℃过夜。应用 AFLP 扩增程序进行预扩增和选择性扩增。预扩增反应体系为 25 μl，其中含有 1×PCR 缓冲液，200 μmol/L dNTPs，0.5 μmol/L 预扩增引物（表 1），1 μl DNA 连接反应混合物，1 U *Taq* DNA 聚合酶。所用到的 dNTP、10×PCR 缓冲液、*Taq* DNA 聚合酶均为 TaKaRa 公司生产。反应条件为：94℃ 30 s，56℃ 1 min，72℃ 1 min，21 个循环，72℃延伸 10 min。预扩增产物稀释 20 倍，供选择扩增用，选择扩增体系同上。条件为：94℃ 30 s，65℃至 56℃ 30 s，72℃ 1 min，13 个循环，每个循环降 0.7℃进行降式 PCR 扩增；94℃ 30 s，56℃ 30 s，72℃ 1 min，23 个循环，72℃延伸 10 min。选择扩增 PCR 产物加上上样缓冲液，94℃变性 10 min 后于 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳分析，银染（联星）后观察。接头、引物序列（生工）见表 1。取同一种 DNA 样品三份在相同条件下平行进行酶切，接头连接，AFLP 预扩增和选择性扩增，变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，通过重复性检测来避免假阳性。

2 结果

2.1 MSAP 分析

为研究大花蕙兰授粉前后子房 DNA 甲基化状态发生的变化，采用 MSAP 技术对大花蕙兰授粉前后子房 DNA 甲基化状态进行分析（图 1）。实验中对 DNA 提取、酶切、接头连接、预扩增及选择性扩增反应均进行了 3 次重复，以避免实验过程中的假阳性。共采用 72 对引物（8 个 E 引物和 9 个 H/M 引物）(表 1) 进行选择性扩增，结果显示 MSAP 带型具有很好的稳定性，并对其进行统计（表 2）。

2.2 大花蕙兰授粉前后子房 DNA 甲基化水平

大花蕙兰子房授粉前后 DNA 两个不同时期 DNA 池分别用限制性内切酶组合 *EcoR* Ⅰ/*Hpa* Ⅱ (H) 和 *EcoR* Ⅰ/*Msp* Ⅰ (M) 分别消化、连接、预扩和选扩增，每个引物组合共产生 4 个泳道；对大小位于 100 bp～500 bp 范围内的片段进行统计，每个泳道各引物组合检测到的片段数目从 15 条到 30 条不等，子房在未授粉及授粉后扩增出的总片段数基本相同（表 2）。授粉前后子房

表 1 MSAP 分析的接头和引物序列

Table 1 Sequence of adapters and primers used for MSAP analysis

	EcoR Ⅰ (E) 5′-3′	*Hpa* Ⅱ/*Msp* Ⅰ (H M) 5′-3′
接头 1 Aapter-1	GACGATGAGTCTAGAA	CTCGTAGACTGCGTACC
接头 2 Aapter-2	CGTTCTAGACTCATC	AATTGGTACGCAGTC
预扩增引物 Pre-selective amplification	GACTGCGTACCAATTC (E00)	GATGAGTCTAGAACGG (H M00)
扩增引物 Selective amplification primers	GACTGCGTACCAATTCAA (E11)	GATGAGTCTAGAACGGTA (H M23)
	GACTGCGTACCAATTCAG (E13)	GATGAGTCTAGAACGGTC (H M24)
	GACTGCGTACCAATTCAAC (E32)	GATGAGTCTAGAACGGTAA (H M79)
	GACTGCGTACCAATTCACA (E35)	GATGAGTCTAGAACGGTAG (H M81)
	GACTGCGTACCAATTCACC (E36)	GATGAGTCTAGAACGGTAT (H M82)
	GACTGCGTACCAATTCACG (E37)	GATGAGTCTAGAACGGTCA (H M83)
	GACTGCGTACCAATTCACT (E38)	GATGAGTCTAGAACGGTGT (H M90)
	GACTGCGTACCAATTCAGC (E40)	GATGAGTCTAGAACGGTTC (H M92)
	GACTGCGTACCAATTCAGG (E41)	

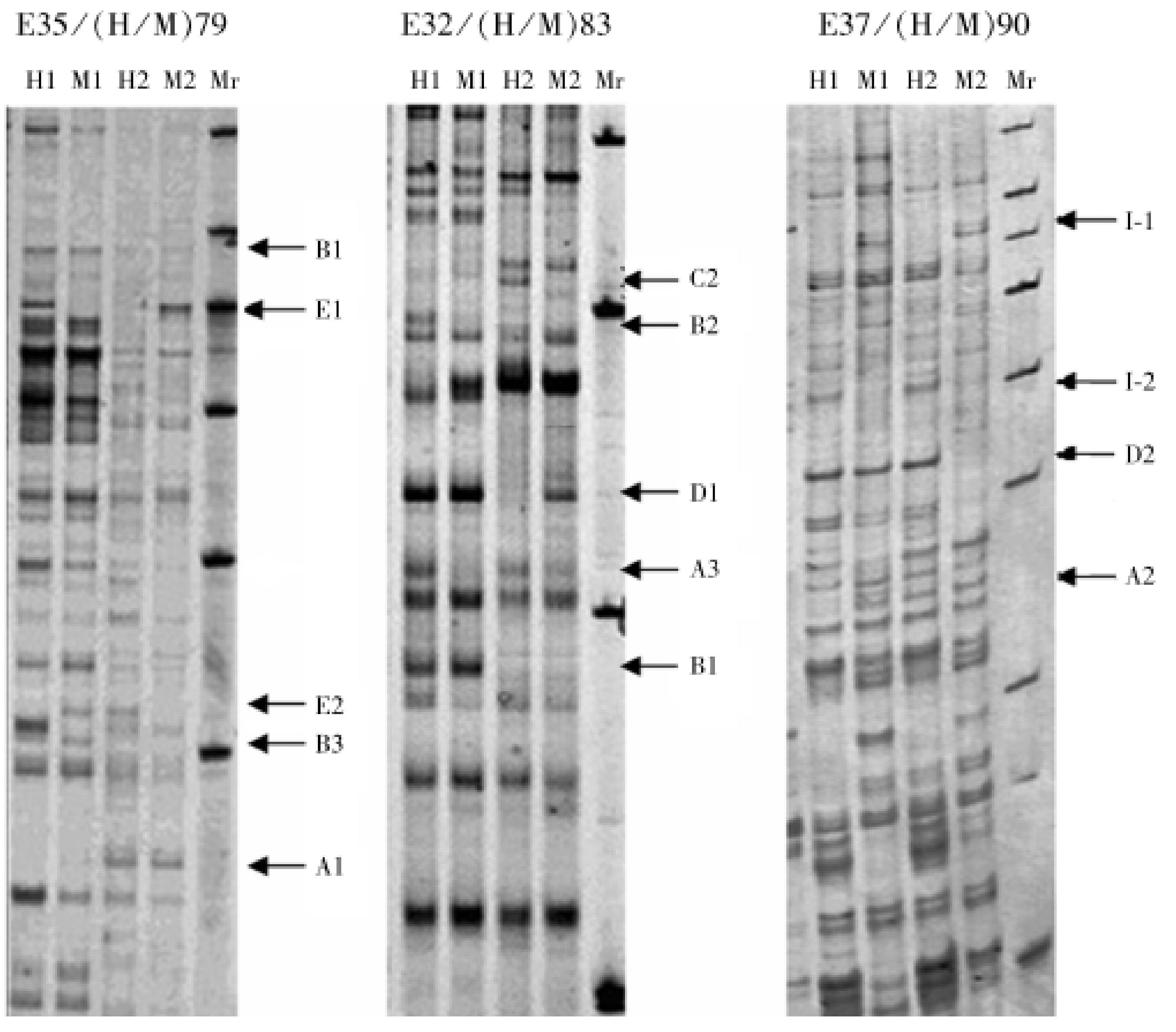


图 1　MSAP 分析大花蕙兰授粉前后子房 DNA 甲基化部分电泳图

H1，授粉前子房 *EcoR* Ⅰ/*Hpa* Ⅱ 的酶切、扩增产物；M1，授粉前子房 *EcoR* Ⅰ/*Msp* Ⅰ 的酶切、扩增产物。H2，授粉后子房 *EcoR* Ⅰ/*Hpa* Ⅱ 的酶切、扩增产物；M2，授粉后子房 *EcoR* Ⅰ/*Msp* Ⅰ 的酶切、扩增产物。扩增所用引物组合标明在其顶部；箭头示授粉前后子房的甲基化差异条带型（表 3）；Mr 代表分子量（50-bp ladder）

Fig. 1　Part of electrophoretic profiles obtained using MSAP in the ovaries from *C. hybridium* before and after pollination

H1, Fragments obtained after digestion with *EcoR* Ⅰ/*Hpa* Ⅱ from non-pollinated ovaries; M1, Fragments obtained after digestion with *EcoR* Ⅰ/ *Msp* Ⅰ from non-pollinated ovaries. H2, Fragments obtained after digestion with *EcoR* Ⅰ/*Hpa* Ⅱ from pollinated ovaries; M2, Fragments obtained after digestion with *EcoR* Ⅰ/ *Msp* Ⅰ from pollinated ovaries. Different methylation patterns among bands of the ovaries before and after pollination are shown by arrowheads (Table 3). Primer combinations were indicated on the top of figure. Mr indicated the molecular weight marker of 50-bp ladder

表 2　大花蕙兰授粉前后子房 DNA 甲基化水平

Table 2　Methylation levels of the non-pollinated and pollinated ovaries from *C. hybridium*

	授粉前子房 non-pollinated ovaries	授粉后子房 pollinated ovaries	授粉前后总数 Total
总扩增带数 Total amplified bands	2942	2950	5892
扩增的甲基化总带数 Total methylated bands	342	284	626
扩增总甲基化率 Total methylation ratio	11.6 %	9.6%	10.6%
全甲基化带数 Full methylated bands[a]	210	179	389
全甲基化率 Full methylation ratio[b]	7.1%	6.1%	6.6%

注：a：全甲基化，双链都为 5′-C^{m}CGG-3′；b：全甲基化 扩增的甲基化总带数

Note：a，full methylation，5′CmCGG in double strands；b，Full methylated bands Total methylated bands

扩增出总片段数分别为 2942 和 2950。其中，总甲基化的位点数（包括全甲基化和只有一条链甲基化的半甲基化）分别为 342 和 284，总扩增位点的甲基化水平分别为 11.6%和 9.6%，而其中全甲基化（双链都为 5′-C^{m}CGG-3′）的带数分别为 210 和 179，全甲基化率分别为 7.1%和 6.1%。

表 3 大花蕙兰授粉前后子房 DNA 甲基化类型，位点数及不同类型所占百分比

Table 3 Different patterns of methylation in the non-pollinated and pollinated ovaries from *C. hybridium*, number of sites and ratio of different patterns

类型 Patterns	授粉前子房 non-pollinated ovaries		授粉后子房 Pollinated ovaries		位点数目 Number of sites	不同类型的比率（%）Ratio of different patterns
	H	M	H	M		
I 型					147	25.6
I-1	0	1	0	1	113	
I-2	1	0	1	0	34	
II 型					427	74.4
A					169	39.6
A1	0	0	1	1	70	
A2	0	1	1	1	44	
A3	1	0	1	1	55	
B					121	28.3
B1	1	1	0	0	52	
B2	1	0	0	0	30	
B3	0	1	0	0	39	
C					32	7.5
C1	0	0	0	1	17	
C2	0	0	1	0	15	
D					78	18.3
D1	1	1	0	1	36	
D2	1	1	1	0	42	
E					27	6.3
E1	1	0	0	1	13	
E2	0	1	1	0	14	

注：“0”示没有差异带，“1”示有差异带；“H”代表 *EcoR* Ⅰ/*Hpa* Ⅱ的酶切、扩增产物，“M”表示 *EcoR* Ⅰ/*Msp* Ⅰ 的酶切、扩增产物。

Notes：“0”stands for the absence of a band，and“1”stands for the present of a band . H and M are the combinations of enzymes of *EcoR* Ⅰ/*Hpa* Ⅱ and *EcoR* Ⅰ/*Msp* Ⅰ，respectively

2.3 大花蕙兰授粉前后子房 DNA 甲基化不同类型

将授粉后子房 DNA 甲基化状态与授粉前子房 DNA 甲基化状态进行比较，根据带型的有无出现 14 种扩增带型（表 3）。14 种带型主要分为两大类，Ⅰ型为单态性位点，它们在授粉前后子房中带型模式相同不表现多态性；Ⅱ型为多态性位点，在授粉前后子房中带型有差异，显示多态性条带。Ⅰ型主要有两种带型，Ⅰ-1 型为全甲基化类型，*Hpa* Ⅱ不能识别并切割，而 *Msp* Ⅰ都能切割，从而产生（0，1，0，1）的带型。反之，I-2 为半甲基化类型，*Hpa* Ⅱ都能识别并切割而 *Msp* Ⅰ都不能切割的位点，产生（1，0，1，0）的带型。具备这两种带型的共有 147 条（表 3），表明有 25.6%（147/574）的大花蕙兰子房 DNA 在授粉前后甲基化状态保持不变。Ⅱ型表明 DNA 甲基化状态在授粉后发生改变，MSAP 带型共有 12 种情况（表 3）。某些片段出现在授粉前子房中，但授粉后却消失了，而另一些片段仅在授粉后子房中才能检测到（图 1），这样的片段共有 427 条。这 427 条多态性片段可以分为 5 组（表 3 A，B，C，D 和 E 组），其中出现频率最高的是 A 和 B 组。A 组有 169 条片段，其特点是在授粉前子房的 H 和 M 泳道都无带，或者仅在其中一个泳道有带，但在授粉后子房的 H 和 M 泳道中同时有带。A1（0，0，1，1），A2（0，1，1，1）和 A3（1，0，1，1）型，暗示授粉后子房在 CCGG 位点发生了完全的去甲基化；B 组有 121 个片段，该组在授粉前子房的 H 和 M 泳道都有带，或者仅在其中一个泳道有带，但在授粉后子房的 H 和 M 泳道中同时无带，有 3 种类型 B1（1，1，0，0），B2（1，0，0，0），B3（0，1，0，0），表明授粉后 *Hpa* Ⅱ和 *Msp* Ⅰ都不能识别和切割该位点，即子房 DNA 双链的两个胞嘧啶碱基均已甲基化；C 组和 D 组表示的是授粉后某些位点甲基化程度有降低和升高的趋势，分别占有 7.5% 和 18.3%；E 组也表示授粉前后的一些甲基化差异带型，仅占 6.3%。

3 讨论

植物不同发育时期的表现状况是不同的，在其生命周期中，需要不断进行各种调节作用以适应环境变化，这取决于基因的转录表达（吴乃虎，2001）。植物 DNA 甲基化水平的变化在这种调节中起着重要的作用（Finnegan 等，2000）。一般情况下，DNA 甲基化与基因表达呈负相关，基因的甲基化可抑制基因表达，而一些处于关闭状态的基因因生长发育的需要也可去甲基化从而活化基因，开启表达（朱玉贤和李毅，1997）。目前，有关 DNA 甲基化在植物学领域的研究正在展开，并逐渐成为研究的热点领域。为研究大花蕙兰授粉前后子房基因组 DNA 甲基化状态发生的变化，本研究采用 MSAP 技术，利用 72 对引物对大花蕙兰授粉前后子房 DNA 胞嘧啶甲基化进行了分析（图 1）。每对引物进行 3 次重复实验，发现 MSAP 带型具有很好的稳定性，说明 MSAP 技术可以有效地应用于大花蕙兰基因组甲

基化分析。

在高等植物中，胞嘧啶发生甲基化的比例因植物种类而异，从 4.6%（Leutwiler 等，1984）到 30%左右不等（Twyman，2001），而且 90%以上的甲基化作用都是发生在 DNA 的 CpG 双碱基序列处。据报道，水稻基因组中有 16.3%发生甲基化（Xiong and Xu，1999）；不同生态型的拟南芥中有 35%～43%（Cervera 等，2002）；小麦 33%（Horvath 等，2003）等；高粱杂交种及其相应亲本甲基化水平为 51.4%～63.0%，全甲基化率为 28.1%～29.1%（仪治本等，2005）。本研究结果显示大花蕙兰基因组的甲基化水平为 9.6%～11.6%，这只是对基因组中部分同裂酶识别位点（CCGG）的胞嘧啶进行了检测，而这些胞嘧啶也只是基因组中的一小部分胞嘧啶，所揭示的甲基化水平只反映了 CG 或部分 CCG 核苷酸序列中的甲基化程度，而在植物中，甲基化也会发生在 CAG、CTG 序列中（McClelland 等，1994）；因而大花蕙兰整个基因组中胞嘧啶的甲基化率可能高于本试验的检出结果。在授粉前后子房中扩增得到的发生了甲基化的 626 个位点数（表 2）中，全甲基化位点数（389）比半甲基化的（237）高得多，大约 2 倍，说明大花蕙兰子房发生单链 DNA 外部胞嘧啶甲基化或是内外胞嘧啶都甲基化现象比双链 DNA 内部胞嘧啶甲基化现象少，这与脐橙品种胞嘧啶甲基化模式研究结果有所不同（洪柳和邓秀新，2005），说明不同植物其 DNA 甲基化水平确实不同。而同一物种在不同组织、不同生长发育时期 DNA 甲基化水平也存在显著差异（Rossi 等，1997；Xiong and Xu，1999；陆光远等，2005；Sherman and Talbert，2002；Portis 等，2004），在玉米中编码胚乳特异性表达的基因，在非表达组织中 DNA 高度甲基化（Rossi 等，1997）；水稻亲本及其杂交种幼苗期 DNA 甲基化程度比旗叶组织要高（Xiong and Xu，1999）；Sherman and Talbert（2002）发现春化使 DNA 去甲基化，从而诱导开花；油菜种子萌发过程中检测到大量的去甲基化事件，是与种子萌发后启动了大量基因的表达相一致的（陆光远等，2005）。因此，DNA 甲基化在细胞分化和器官发育过程中可能起到重要作用，植物通过 DNA 甲基化和去甲基化的方式实现基因的有序表达。本研究中检测到大花蕙兰授粉前后子房总扩增位点的甲基化水平和全甲基化率均存在差异，而且无论从总扩增位点甲基化率（11.6%和 9.6%）和全甲基化率（7.1%和 6.1%）（表 2）来看，授粉后子房的甲基化水平都略低于未授粉子房，授粉后子房发育过程中检测到大量去甲基化事件，这可能可以从另一方面解释大花蕙兰授粉后子房才开始发育这一现象，授粉使某些基因去甲基化从而活化基因，细胞开始分裂，继而子房发育。

从甲基化带型分析发现（图 1），大花蕙兰子房授粉后除 DNA 甲基化水平改变外，甲基化的位置也会发生变化，在授粉前后大花蕙兰子房之间有大量甲基化带型的改变，DNA 甲基化模式非常丰富。通过对大花蕙兰授粉前后子房 DNA 甲基化模式统计分析（表 3）发现，单态性扩增和多态性扩增位点分别占总甲基化多态性扩增位点数的 25.6%和 74.4%，这很明显地说明授粉后大花蕙兰子房 DNA 甲基化水平和模式相对于授粉前都发生了显著变化。模式的改变主要通过重新甲基化和去甲基化而引起。本实验得到的 427 个多态性扩增位点，其中占绝大多数的带主要属 A 组和 B 组（表 3），两者约占总甲基化多态性扩增位点的比例为 67.9%（（121 + 169）/427），其中，A 组表示完全去甲基化的带型特征，B 组带型为授粉后某些位点重新甲基化的结果。C，D 和 E 组位点数总和占总甲基化多态性扩增位点数的 32.1%，这三组甲基化扩增带型反映了授粉后子房比授粉前相应子房甲基化水平有所减少和增加的现象，表现为不完全的去甲基化和甲基化；正是这种不完全的去甲基化和甲基化使其位点可作为去甲基化和重新甲基化的靶位点，进而成为细胞内调节的潜在因子（Finnegan 等，2000）。综上所述，本研究的结果充分表明，大花蕙兰子房授粉前后多种基因的差异表达与其授粉作用密切相关，并且大花蕙兰子房授粉前后基因型表达的差异主要表现在转录水平上。DNA 甲基化水平的改变作为基因转录调控的一种重要手段无疑在授粉后某些基因的转录中发挥重要作用，通过调节启动子区域或基因内部的甲基化状态来控制基因转录效率，从而促进子房发育，这在一定意义上为揭示兰花子房发育的分子机制奠定基础。

〔参 考 文 献〕

Cervera MT, Ruiz-Garcia L, Martinez-Zapater JM, 2002 . Analysis of DNA methylation in Arabidopsis thaliana based on methylation-sensitive AFLP markers [J] . *Mol Genet Genomics*, **268**: 543—552

Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES, 2000 . DNA methylation, a key regulation of plant development and other processes [J] . *Curr Opion Genet Develop*, **10**: 217—223

Gonzalgo ML, Jones PA, 1997 . Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation [J] . *Mutat Res*, **386**: 107—118

Hong L (**洪柳**), Deng XX (**邓秀新**), 2005 . Analysis of DNA methylation in navel oranges based on MSAP marker [J] . *Sci Agric Sin* (**中国农业科学**), **38** (11): 2301—2307

Horvath E, Szalai G, Janda T, 2003 . Effect of vernalization and 5-azacytidine on the methylation level of DNA in wheat (*Triticum aestivum* L ., cv . Martonvasar 15) [J] . *Plant Sci*, **165**: 689—692

Hua Y (**华扬**), Chen XF (**陈学峰**), Xiong JH (**熊建华**) *et al*., 2005 . Isolation and analysis of differentially-methylated fragment CI-DM7 in rice induced by cold stress [J] . *Hereditas* (**遗传**), **27** (4): 595—600

Jablonka E, Lamb MJ, 2002 . The changing concept of epigenetics [J] . *Ann N YAcad Sci*, **981**: 82—96

Janousek B, Matsunaga S, Kejnovsky E *et al*., 2002 . DNA methylation analysis of a male reproductive organ specific gene (MROS1) during pollen development [J] . *Genome*, **45**: 930—938

Leutwiler LS, Hough-Evans BR, Meyerowitz EM, 1984 . The DNA of *Arabidopsis thaliana* [J] . *Mol Gen Genet*, **194**: 15—23

Lu GY (**陆光远**), Wu XM (**伍晓明**), Chen BY (**陈碧云**) *et al*., 2005 . MSAP analysis of DNA methylation during and following *Brassica rapa* Seed Germination [J] . *Chin Sci Bull* (**科学通报**), **24** (50): 2750—2756

Lund G, Messing J, Viotti A, 1995 . Endosperm specific demethylation and activation of specific alleles of alpha-tubulin genes of *Zea mays* [J] . *Mol Gen Genet*, **246** (6): 716—722

McClelland M, Nelson M, Raschke E, 1994 . Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases [J] . *Nucleic Acids Res*, **22**: 3640—3659

Murray MG, Thompson WF, 1980 . Rapid isolation of high weight plant DNA [J] . *Nucleic Acids Res*, **8**: 4231—4235

Portis E, Acquadro A, Comino C, 2004 . Analysis of DNA methylation during germination of peper (*Capsicum annuum* L) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) [J] . *Plant Sci*, **166** (1): 169—178

Reyna-Lopez GE, Simpson J, RuizHerresa J, 1997 . Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms [J] . *Mol Gen Genet*, **253**: 703—710

Rossi V, Motto M, Pellegrini L, 1997 . Analysis of the methylation pattern of the maize Opaque-2 (02) promoter and *in vitro* binding studies indicate that the 02 B-Zip protein and other endosperm factors can bind to methylated target sequences [J] . *J Biol Chem*, **272**: 13758—13771

Sherman JD, Talbert LE, 2002 . Vernalization induced changes of the DNA methylation pattern in winter wheat [J] . *Genome*, **45**: 253—260

Tanaka H, Masuta C, Uehara K *et al*., 1997 . Morphological changes and hypomethy-lation of DNA in transgenic tobacco expressing antisense NA of the S-adenosyl-L -homocysteine hydrolase gene [J] . *Plant Mol Biol*, **35**: 981—986

Twyman RM, 2001 . Advanced Molecular Biology: A Concise Reference [M] . Beijing: Science Press, 185—194

WangL, Zhang X, 1999 . Expression and sequence analysis of a cDNA relative to orchid ovule development [J] . *Acta Bot Sin*, **41** (3): 276—279

Wu NH (**吴乃虎**), 2001 . Principle of Gene Engineering (the second edition) [M] . Beijing: Science Press, 186—188

Xiong LZ, Xu CG, 1999 . Maroof M A S . Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation sensitive amplification polymorphism technique [J] . *Mol Gener Genet*, **261**: 439—446

Yi ZB (**仪治本**), SY (**孙毅**), Niu TT (**牛天堂**) *et al*., 2005 . Patterns of DNA cytosine methylation between hybrids and their parents in sorghum genome [J] . *Acta Agronom Sin* (**作物学报**), **9** (31): 1138—1143

Zhu GF (**朱根发**), Guo ZF (**郭振飞**), 2004 . Progress on molecular biology of main ornamental Orchidaceae [J] . *Chin Bull Bot* (**植物学通报**), **21** (4): 471—477

Zhu YX (**朱玉贤**), Li Y (**李毅**), 1997 . Modern Molecular Biology [M] . Beijing: Higher Education Press, 1305—1314